

# Microorganism, medium and process for preparing hyaluronic acid

Patent number: CN1099068  
Publication date: 1995-02-22  
Inventor: PARK MYOUNG GYU (KR), JANG JAE DEOG (KR),  
KANG WHAN KOO (KR)  
Applicant: LUCKY LTD (KR)  
Classification:  
- international: C12P19/26; C12P19/00; (IPC1-7) C12N1/20;  
C12N15/01; C12P19/04; C12P19/26  
- european: C12P19/26; C12R1/46  
Application number: CN19940104439 19940415  
Priority number(s): KR19930006423 19930416; KR19930006424 19930416

Also published as:



EP0625579 (A1)  
US5496726 (A1)  
JP6319580 (A)  
EP0625579 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for CN1099068

Abstract of corresponding document: **EP0625579**

The present invention relates to a novel mutant of *Streptococcus zooepidemicus* producing high molecular weight hyaluronic acid; to a process for preparing said hyaluronic acid by employing said microorganism; and to a medium suitable for the culture of a microorganism producing hyaluronic acid.

BEST AVAILABLE COPY

Fig. 1

Fermentation profiles

Fig. 1A *Streptococcus zooepidemicus* LBF707

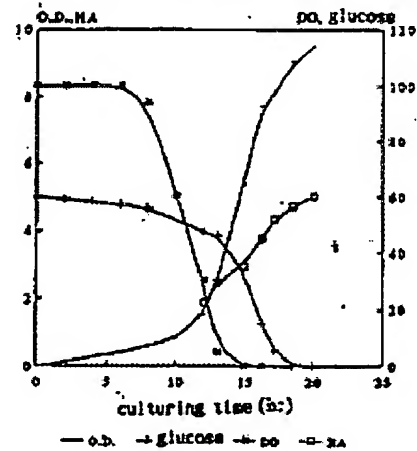
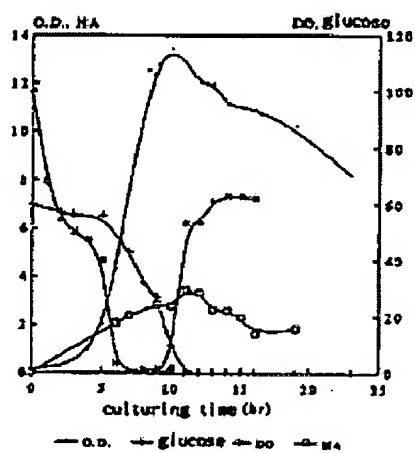


Fig. 1B *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 35246)



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94104439.4

[51]Int.Cl<sup>5</sup>

[43]公开日 1995 年 2 月 22 日

C12N 1/20

[22]申请日 94.4.15

[30]优先权

[32]93.4.16 [33]KR[31]6423 / 93

[32]93.4.16 [33]KR[31]6424 / 93

[71]申请人 株式会社乐喜

地址 韩国汉城市

[72]发明人 朴明奎 张在德 姜焕求

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

C12N 15 / 01 C12P 19 / 26

C12P 19 / 04

／ / (C12N1 / 20, C12R1 : 46)

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 制备透明质酸的微生物、培养基和方法

[57]摘要

本发明涉及一种属于链球菌属的新型的微生物，其能生产出高分子量的透明质酸；使用所述的微生物生产所述的透明质酸的方法；以及适于培养产透明质酸的微生物的培养基。

(BJ)第 1456 号

1、一种具有增强的高分子量透明质酸产率的兽疫链球菌突变菌株，其是由下述方法制得的，该方法包括：

采用N - 甲基 - N' - 硝基 - 亚硝基胍对兽疫链球菌ATCC 35246 进行至少三次致突变作用，由此生产突变菌株；并且从其中选择无溶血活性和透明质酸酶活性的菌株。

2、如权利要求1 所述的具有增强的高分子量透明质酸产率的突变菌株，其为兽疫链球菌LBF 707，保藏号为CCTCC M 94023。

3、生产透明质酸的方法，包括对权利要求1 或2 的突变菌株进行培养。

4、以高收率生产高分子量透明质酸的方法，包括将属于链球菌属的一种微生物在一种培养基中进行培养，其中向该培养基中加有尿核甙。

5、如权利要求4 所述的方法，其中所述的微生物为兽疫链球菌LBF 707，保藏号为CCTCC M 94023。

6、如权利要求4 或5 所述的方法，其中所述的尿核甙的浓度为0.1 至5.0 g /l。

## 制备透明质酸的微生物、培养基和方法

本发明涉及能生产高分子量的透明质酸的新型微生物，使用该微生物制备所述的透明质酸的方法，以及为生产所述的透明质酸，用于培养该微生物的合适的培养基。

本领域熟知的是，透明质酸是一种无色、透明和高粘性的线性多糖，其分子量在50 k d a 至13,000 k d a 之间，其分子链中具有直链的、 $\beta$  - (1, 4) - 葡萄糖醛酸和 $\beta$  - (1, 3) - N - 乙酰基葡萄糖胺交替排列的链段。已发现透明质酸及其盐具有很多用途，例如在眼科手术中用作透明体替换物和用作眼睛的滴剂，以及在化妆品组合物中用作湿润剂。通常，透明质酸是从动物组织中抽提或用一些微生物培养而制得。

例如，美国专利4,141,973 (B a l a z ) 描述了一种从动物组织中抽提制备透明质酸的方法，该方法是通过将动物组织进行纯化或除去其中的生物聚合物杂质，例如硫酸软骨素和氨基葡聚糖 (g l y c o s a m i n o g l y c a n )，而制得透明质酸。由于该方法费用高且效率低，因此一般认为该方法不适合用作大规模生产透明质酸。

因此，已经提出了许多种采用微生物，特别是属于链球菌属 (g e n u s S t r e p t o c o c c u s ) 的那些微生物来制备透明质酸。已经用于生产透明质酸的举例微生物包括：酿脓链球菌 (S . p y r o g e n e s )，粪链球菌 (S . f a e c a l i s )，S .

e p i d e m i c u s ) , 马链球菌 ( S . e q u i ) , 类马链球菌 ( S . e q u i s i m i l i s ) 等; 并且它们在伯杰氏手册中被分在 L a n s f i e l d 血清组 A 或 C 。也有报道说它们是具有  $\beta$  溶血作用的溶血链形成的球菌 ( c o c c i ) 。例如, 在已公开的日本专利申请 5 6 6 9 2 / 1 9 8 3 和 5 0 0 9 9 7 / 1 9 8 5 , 已公开的韩国专利申请 9 2 - 9 4 9 4 和 8 7 - 1 1 2 5 中, 披露了采用链球菌属微生物生产透明质酸的方法。

此外, 已经开发出了许多采用链球菌属微生物来改善透明质酸产率的制备透明质酸的方法。例如, 已公开的韩国专利申请 9 0 - 5 7 7 4 披露了一种方法, 该方法是通过调节磷酸盐的浓度来提高透明质酸的产率; 已公开的日本专利申请 2 5 7 9 0 1 / 1 9 8 7 披露了一种采用丙酮酸盐、氨基葡萄糖等的方法; 已公开的日本专利申请 2 2 5 4 9 1 / 1 9 8 9 披露了一种采用含有一个或多个羟基自由基的芳香族化合物的方法; 和已公开的日本专利申请 1 4 1 5 9 4 / 1 9 8 8 和 2 8 9 1 9 8 / 1 9 8 7 披露了一种采用氨基酸的方法。

但是, 这些方法的缺点是: 所生产的透明质酸的分子量相对较低; 例如在 3 0 0 k d a 至 3 , 0 0 0 k d a 的范围内, 并且收率低。结果是, 由此生产的透明质酸在使用时湿润效果差, 例如当其用于化妆品中时, 而且使用时其性能差, 例如在眼科手术过程中, 或是作为关节炎的治疗剂时。

因此, 本发明的一个主要目的是提供一种新型的能以高收率生产出高分子量的透明质酸的突变微生物。

生产高分子量的透明质酸的方法。

本发明的再一个目的是提供一种培养微生物的合适的培养基，使得能够高效率地生产出高分子量的透明质酸。

按照本发明的一个方面，提供了一种属于链球菌属的新型的微生物，该微生物没有透明质酸酶活性和溶血活性，并且能够生产出高分子量的透明质酸。

按照本发明的另一方面，提供了一种适合于从链球菌属的一个菌株以高收率得到所述的高分子量的透明质酸的培养基，其中，所述的培养基包含尿核甙。

#### 附图简要说明

结合附图，本发明的上述的和其他的目的及特征从下述的对本发明的优选实施方案的描述中可以很清楚地看出来。附图中：

图1 A 和1 B 分别描述了兽疫链球菌ATCC 35246 和本发明的兽疫链球菌LBF 707 的发酵型图 (fermentation profiles) ;

图2 示出了由本发明得到的透明质酸的分子量与采用兽疫链球菌ATCC 35246 生产的透明质酸的分子量以及商品透明质酸的分子量的比较图；

图3 描述了由本发明方法得到的透明质酸的特性粘度 (intrinsic viscosity) 随其浓度的变化曲线与采用现有技术中的方法得到的透明质酸的特性粘度随其浓度的变化曲线的比较图；以及

图4 描述了尿核甙对透明质酸的特性粘度的影响。

按照本发明，属于链球菌属、没有透明质酸酶活性

生物是这样得到的：使已知的兽疫链球菌ATCC 35246致突变。该致突变方法包括用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)对亲代微生物(parent microorganism)至少处理三次。也就是说，按照本发明，在第一次用NTG对已知的微生物进行处理后，制备和选择出没有溶血活性的突变菌株，随后对其用NTG进行第二次处理，以得到没有透明质酸酶的菌株，所述的透明质酸酶能使透明质酸催化分解。此后，将由此得到的菌株用NTG进行第三次处理，随后将其接种到一固体培养基中，以收集快速生产的、高粘性的大的菌落(colonies)，作为具有优异的透明质酸产率的突变菌株。

按照上述程序选择的突变菌株没有透明质酸酶和溶血活性，并且能够生产出平均分子量高于，例如3,500 kda的高分子量透明质酸。一种所述的突变菌株被命名为“兽疫链球菌LBF 707”(“Streptococcus zooepidemicus LBF 707”)，并按照布达佩斯条约的有关条款，即用于专利程序目的微生物保藏的国际认可，于1993年1月29日保藏于韩国典型培养物中心(KCTC)，保藏号为KCTC0075BP。

所述的兽疫链球菌LBF 707(Streptococcus zooepidemicus LBF 707)已于1994年4月11日在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)进行了保藏，保藏号为CCTCC M 94023。

一般来说，用于繁育属于链球菌属的微生物的培养



源，可以使用淀粉，葡萄糖，蔗糖，半乳糖，果糖及其类似物；优选是葡萄糖。作为氮源，可以使用硫酸铵，硝酸铵，硝酸钠，酪蛋白氨基酸，酵母抽提物，胨，胰化胨等。此外，如果需要的话，还可以加入氯化钠、磷酸二氢钠，磷酸氢二钠，硫酸亚铁，氯化钾，硫酸镁等。

按照本发明，已经发现，透明质酸的收率和分子量随着孵育产透明质酸的微生物，例如上述的新型的微生物的培养基中尿核甙的加入而相应地增加。

因此，每1升本发明的培养基优选是含有：10至100克葡萄糖，0.5至3.0克硫酸镁，1.0至5.0克磷酸二氢钾，1.0至10.0克酵母抽提物，10.0至20.0克酵母胨，和1.0至5.0克尿核甙；更优选的是含有：50至70克葡萄糖，0.7至1.5克硫酸镁，1.5至2.5克磷酸二氢钾，4.0至6.0克酵母抽提物，13.0至17.0克酵母胨和0.5至1.0克尿核甙。

此外，优选是在33℃至38℃的温度范围内，同时调节培养基的pH值为7.0至7.5以及维持换气速率在0.1至1.0 VVM的条件下，对微生物进行需氧培养。

在对所述的微生物进行培养后，培养基中存在的透明质酸通常是以其盐的形式，例如钠盐的形式存在。

所述的微生物的培养完成之后，可以采用已知的分离和纯化多糖的方法回收存在于所述的培养基中的透明质酸 (Akasaka, Hinododo, J. Soc. Cosmet. Chem. Japan, 22, 35-42 (1988))。

可达到2.5至6.0克/升的水平，而且其平均分子量高于3,500 kda。采用卡哇法对透明质酸进行定量分析 (Z. Dische, J. Biol. Chem., 167, 189 (1947))。采用高效液相色谱法 (HPLC) 和粘度测定法确定透明质酸的分子量。采用高效液相色谱法 (HPLC) 时，用洗脱标准物质聚环氧乙烷得到标准曲线，然后在同样的条件下洗脱透明质酸，参照所述的标准曲线得出其分子量 (P. Chabreck, Chromatographia, 30, 201-204 (1990); Narlin B. Beatty, Anal. Biochem., 147, 387-395 (1985); Noriko Motohashi, J. Chrom., 299, 508-512 (1984))。采用粘度测定法时，使用粘度计测定一系列的稀释的透明质酸的特性粘度，并绘出粘度随透明质酸的浓度变化的曲线。用外推法得出溶液中透明质酸的浓度为零时的溶液的极限特性粘度；随后按照下述的Narlin方程式 (Anal. Biochem., 147, 387-395 (1985)) 计算出透明质酸的分子量：

$$\text{极限特性粘度} = 0.000356 \times \text{MW} \exp (1.0699)$$

下述的实施例仅用来解释本发明，而不是限制本发明的范围。

#### 实施例1：突变菌株的筛选

##### 步骤1) 没有溶血活性的菌株的制备

将兽疫链球菌 (*Streptococcus zooepidemicus*) (ATCC 35246) 孵育于25 ml Todd-Hewitt 液体培养基中 (Difco, USA, Cat. No. 0492-05-0), 并在振摇下37 °C培养14小时。此后, 将得到的2.5 ml 培养物再次孵育于25 ml Todd-Hewitt 培养基中, 并在振摇下在37 °C培养, 直至达到指数生长阶段 (exponential growth phase)。随后, 将1 ml 培养物在4 °C离心分离 (5,000 ×g, 5分钟), 收集沉淀物并分别用1 ml Tris-顺丁烯二酸盐缓冲溶液 (每1升溶液中含有Tris 6克, pH6.0, 顺丁烯二酸5.8克, 硫酸铵1克, 硫酸亚铁0.25毫克, 硫酸镁0.1克, 硝酸钙0.005克) 洗涤二次。将洗涤后的沉淀物悬浮于1 ml 的上述缓冲溶液中, 随后加入N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍 (NTG), 使其浓度达到100至200 μg/l, 随即在37 °C振摇20至30分钟或静置60至120分钟, 使其致突变。

将经由NTG处理后得到的悬浮液在4 °C离心分离 (5,000 ×g, 5分钟), 收集沉淀物后用上述的缓冲溶液洗涤数次以除去其中残留的NTG。将得到的细胞球 (cell pellets) 再悬浮于上述的缓冲溶液中。将得到的1 ml 悬浮液孵育于25 ml Todd-Hewitt 培养基中, 随后在37 °C振摇18小时以增加可见突变细胞的数目。

得到的培养物用生理食盐水稀释, 并将稀释的溶液

该培养基含有5 %血，将其在37 °C孵育48 小时。由于具有溶血活性的菌落在其周围形成一洁净区 (clear zones)，选择没有溶血活性的非澄清区域中的那些菌落作为突变菌落。

#### 步骤2 ) 不能产生透明质酸酶的菌株的制备

重复上述步骤1 ) 所述的相同的过程，以使由上述步骤1 ) 得到的没有溶血活性的突变菌落致突变。将所述的菌落用生理食盐水进行悬浮和稀释，然后加入到加有含400  $\mu$ g 透明质酸和1 %白蛋白第V部分 (albumin fraction V) (Sigma Co., Cat. No. A-2153) 的Todd-Hewitt 琼脂培养基的平皿中。将该平皿在潮湿的室内37 °C放置2 至5 天后，向其中加入10 ml 2 N 乙酸盐溶液，然后将该平皿静置10 分钟。透明质酸和白蛋白在乙酸盐溶液中结合形成沉淀，该沉淀转化成不透明的培养基。如果是产透明质酸酶的菌落，其消化透明质酸而使溶液呈澄清状态。因此，选择能使溶液呈不透明状态的菌落，该菌落不能产生透明质酸酶。

#### 步骤3 ) 具有优异的透明质酸产率的 突变菌株的制备

重复上述的步骤1 ) 所述的相同的程序，以使由上述的步骤2 ) 得到的突变菌落致突变。将所述的菌落用生理食盐水稀释，并加入到加有Todd-Hewitt

放置48小时。在步骤3)中,使用兽疫链球菌(ATCC 35246)作为对照组。选择粘度比对照组高、尺寸比对照组大的那些菌落作为突变菌株,其具有优异的透明质酸产率。

#### 步骤4) 生产高分子量的透明质酸的 突变菌株的制备

采用由上述的步骤3)得到的突变菌株,实施下述的筛选步骤,以选择能生产高分子量的透明质酸的理想的菌株。

3克Todd-Hewitt培养基溶于150 ml蒸馏水中,并将得到的溶液在121℃消毒灭菌15分钟。将每一突变菌落分别接种到上述的消毒灭菌过的培养基中,并在37℃孵育15小时作为种子培养物。在一5升的发酵罐中加入3升培养基,每升所述的培养基含有60克葡萄糖,1.0克硫酸镁,2.0克磷酸二氢钾,5.0克酵母抽提物,15.0克酵母胨和0.75克尿核甙,并且该培养基是在121℃蒸汽消毒灭菌过的。然后,向其中加入150 ml上述的种子培养物,在保持pH值为7.1、温度为35℃、换气速度为0.5 vvm的条件下,培养24小时。

将培养物用0.45  $\mu$ m的滤网过滤,滤液用高效液相色谱进行分离,选择最快地被洗脱出的菌株作为产透明质酸的突变菌株,由此得到的突变菌株生产出的透明质酸的分子量,比由兽疫链球菌ATCC 35246生产出的透明质酸的分子量要高得多。已经测定出,

高于3,500 k d a。

### 步骤5) 突变菌株的细菌学性质

本发明得到的突变菌株表现出下述的细菌学性质:

革兰氏染剂: 阳性

在10 °C时的生长: 阴性

在45 °C时的生长: 阴性

在6.5 % 盐水中的生长: 阴性

在pH 9.6 时的生长: 阴性

在40 % 胆汁中的生长: 阴性

精氨酸降解性: 阳性

马尿酸盐降解性: 阴性

七叶武降解性: 阴性

抗枯草杆菌肽 (b a c i t r a c i n ) 性: 阴性

糖降解性

葡萄糖, 麦芽糖, 蔗糖, 山梨糖醇, 乳糖: 阳性

甘露醇, 丙三醇, 苡蜜糖: 阴性

从上面所述可以看出, 本发明新型的突变菌株具有与测定细菌学伯杰氏手册 (B e r g e y ' s M a n n u a l o f D e t e r m i n a t i v e B a c t e r i o l o g y (1974)) 中所描述的那些兽疫链球菌相同的性质, 只是它们没有溶血活性和产透明质酸酶的能力, 其被命名为兽疫链球菌L B F 7 0 7。

比较实施例1: 透明质酸收率的比较

比较了用由实施例1 的步骤4 ) 得到的兽疫链球菌 L B F 7 0 7 和用兽疫链球菌 A T C C 3 5 2 4 6 来生产透明质酸的收率。从图1 可以看出, 使用本发明的新型突变微生物时, 单位体积的透明质酸的收率比使用兽疫链球菌 A T C C 3 5 2 4 6 时要高出约2 0 %。

## 比例实施例2 : 分子量的比较

用高效液相色谱对分别由本发明的上述突变微生物和由兽疫链球菌 A T C C 3 5 2 4 6 得到的透明质酸的分子量与从动物组织抽提得到的商品透明质酸的分子量进行了比较, 这些商品透明质酸例如可以是 H E A L O N ( P h a r m a c i a A B , S w e d e n , l o t N o . R H 4 1 4 0 1 ) 和 A R T Z ( B i o c h e m i c a l I n d u s t r y I n c . , J a p a n ) 。

从图2 可以看出, 由本发明的突变菌株, 即兽疫链球菌 L B F 7 0 7 生产的透明质酸的分子量最高。

此外, 用粘度计测定了由使用本发明的兽疫链球菌 L B F 7 0 7 生产的透明质酸和从动物组织中抽提得到的商品透明质酸即, H E A L O N 和 A M V I S C ( J o h n s o n & J o h n s o n , U S A ) 的粘度。如图3 所示, 由本发明的突变菌株生产的透明质酸的极限特性粘度最高。采用 N a r l i n 方程式, 根据它们的极限特性粘度, 分别计算出了这些透明质酸的分子量。结果是, 由兽疫链球菌 L B F 7 0 7 生产的透明质酸的平均分子量为 3 , 8 0 0 k d a , H E A L O

“ 平均分子量为3 , 1 0 0 k d a 。

## 实施例2：在含有尿核甙的培养基中对微生物的培养

在5 个5 升的发酵罐中，分别都加入3 升培养基，每升所述的培养基含有：6 0 克葡萄糖，1 . 0 克硫酸镁，2 . 0 克磷酸二氢钾，5 . 0 克酵母抽提物，和1 5 . 0 克酵母脲。向这五个罐中，以其中的每升培养基计，分别加入0 , 0 . 5 , 0 . 7 5 , 1 . 0 和2 . 0 克尿核甙。所述的培养基在1 2 1 °C消毒灭菌2 0 分钟，然后向其中加入1 5 0 m l 兽疫链球菌A T C C 3 5 2 4 6 的种子培养物，并在保持p H 值为7 . 2 , 温度为3 5 °C 以及换气速率为0 . 5 v v m 的条件下，培养2 4 小时。然后测定每一培养基中透明质酸的浓度，结果列于下表1 中。

表1 透明质酸的收率随尿核甙浓度的变化

培养基中尿核甙的浓度 (g /l )	0 (对照)	0.5	0.75	1.0	2.0
透明质酸的收率 (g/l)	3.5	4.1	4.8	4.8	5.0



的产量。

### 比较实施例3：在有或没有尿核甙的培养基中生产的透明质酸的分子量的比较

采用相同的培养基组合物和相同的培养条件重复如实施例2所述的相同的培养程序，只是将尿核甙的浓度固定为0.75 g/l。当培养结束时，经测定培养基中透明质酸的浓度为4.8 g/l。

将本比较实施例中得到的透明质酸的分子量与实施例2的对照组的透明质酸的分子量进行比较。图4示出了在有或没有尿核甙的培养基中生产的透明质酸，其特性粘度（以及其极限特性粘度）随其浓度的变化曲线。图4中，NH<sub>2</sub>-C t r l 代表在没有尿核甙的培养基中得到的透明质酸（实施例2，对照组），NH<sub>2</sub>-U n i d 表示在有尿核甙的培养基中得到的透明质酸（本比较实施例，实验组）。对照组的极限特性粘度值为约3,000 ml/g，而实验组则约为3,400 ml/g。将所述极限特性粘度值代入如前所述的N a r l i n 方程式中，即可计算出对照组和实验组的透明质酸的分子量，对照组的为约3,000 k d a，实验组的则为约3,400 k d a。这一结果表明，在培养基中加入尿核甙，可以增加透明质酸的分子量。

### 实施例3：新型微生物的批培养物 (B a t c h C u l t u r e)

基含有：60克葡萄糖，1.0克硫酸镁，2.0克磷酸二氢钾，5.0克酵母抽提物，15.0克酵母胨和0.75克尿核甙。

将该培养基在121℃消毒灭菌20分钟，随后将150ml 兽疫链球菌LBF 707的种子培养物溶液加入到其中，并在保持pH为7.1至7.3，温度为35至38℃，换气速率为0.1vvm至1.0vvm的条件下培养24小时。培养结束后，培养基中的透明质酸的浓度为6.0g/l，透明质酸的平均分子量为约3,500kda。

#### 实施例4：新型微生物的加料批培养

物 (Fed-batch Culture)

开始时，培养基采用与实施例3中相同的培养基组合物和相同的条件进行，只是葡萄糖的浓度为40g/l。12到18小时后，培养物转化成加料批培养物 (fed-batch culture)，向其中加入葡萄糖，以维持培养基中葡萄糖的浓度低于10g/l。继续培养24至36小时，直至其中的透明质酸的浓度不再增加时为止。培养结束时，培养物溶液中透明质酸的浓度为5.0g/l，并且透明质酸的平均分子量约为3,500kda。

尽管用上述的特殊的实施方案对本发明进行了描述，应该理解的是，本领域的熟练技术人员可以对本发明进行各种各样的修正和变化。对本领域的熟练技术人员来说，这些修正和变化是显而易见的，并落在本发明的由



图 1A 普疫链球菌LBF 707

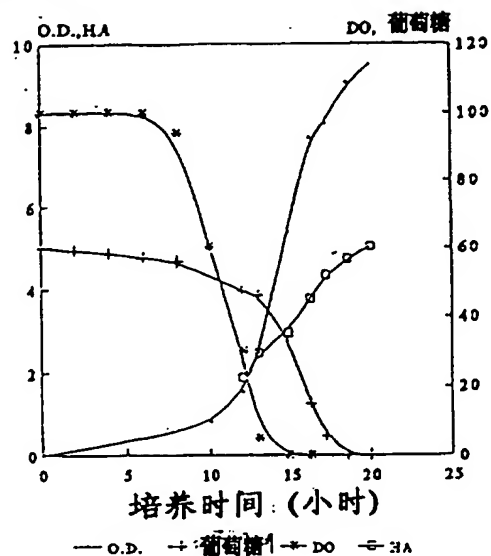


图 1B 普疫链球菌ATCC 35246

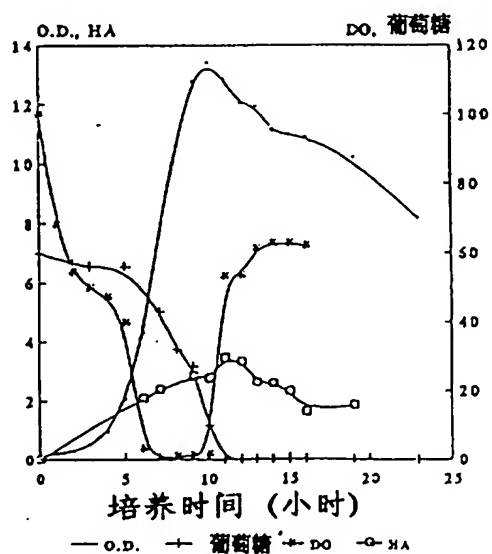


图2

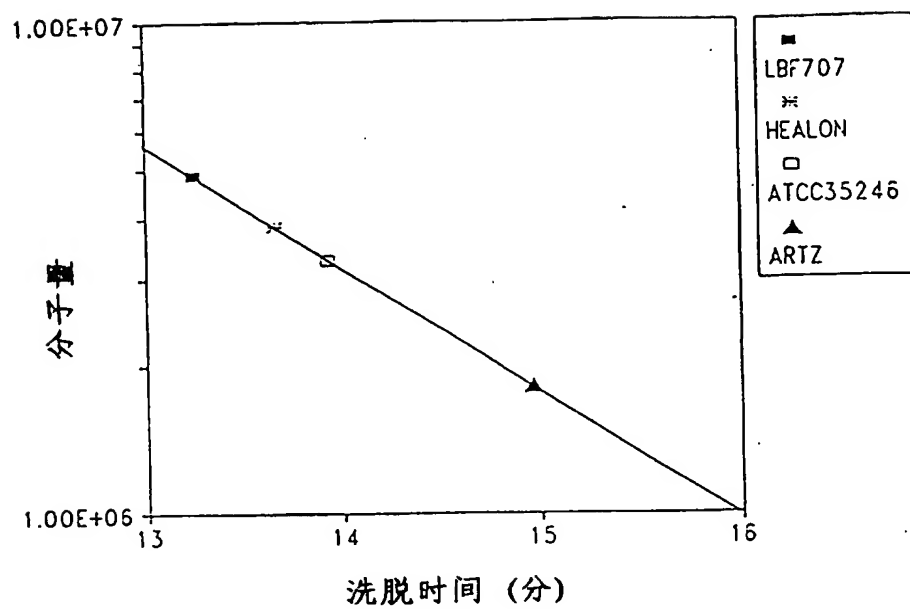


图3

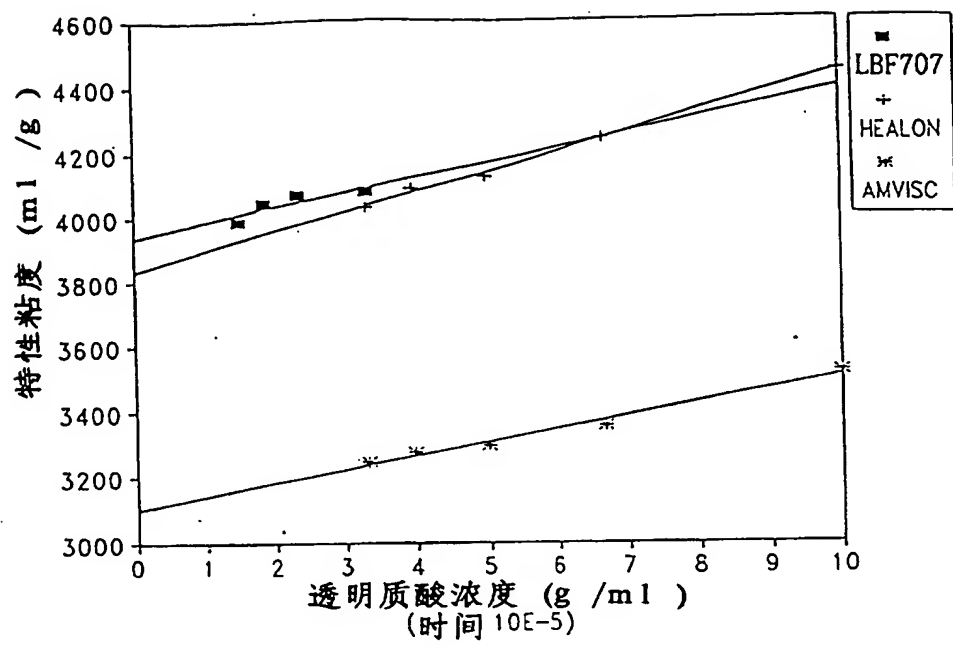
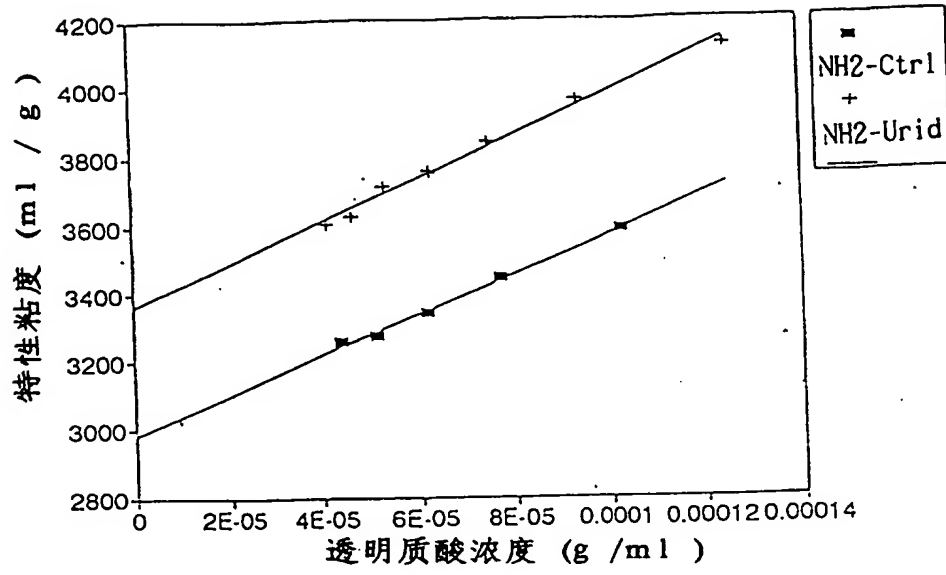


图4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ ~~BLACK BORDERS~~
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**